médecine/sciences 1993 ; 9 : 975-81

La morphogenèse du cerveau postérieur : vers une analyse moléculaire d'un processus de segmentation chez les vertébrés

Chez les vertébrés, le système nerveux central (SNC) se constitue à partir d'une structure épithéliale tubulaire, elle-même issue de l'induction de la partie dorso-médiane de l'ectoderme par le mésoderme sous-jacent. Le tube neural subit des processus morphogénétiques complexes qui aboutissent, en particulier, à des variations régionales de l'identité, de l'organisation et de la connectivité des cellules nerveuses qui sont à la base de la diversité des fonctions que peut exercer le SNC. La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires qui sont responsables de cette différenciation du SNC constitue un défi majeur auquel est aujourd'hui confrontée la biologie du développement. Le rhombencéphale ou cerveau postérieur — la région du tube neural qui va donner naissance au bulbe rachidien, au pont et à une partie du cervelet — est transitoirement organisé en une série de modules ou segments disposés le long de l'axe antéro-postérieur. Ces segments constituent des unités d'organisation et de compartimentation cellulaires ainsi que des unités d'expression génétique. La segmentation, c'est-à-dire l'apparition de telles structures répétées, homologues, le long d'un axe embryonnaire est une stratégie de développement qui a connu un grand succès au cours de l'évolution, car elle permet de bâtir des structures complexes à partir d'éléments plus simples. Bien que des progrès spectaculaires aient été accomplis au cours des dix dernières années dans la compréhension des bases moléculaires de la segmentation chez la drosophile, nos connaissances concernant les phénomènes de segmentation chez les vertébrés sont encore très limitées. Cependant, les résultats prometteurs obtenus dans le cas de l'analyse de la segmentation du rhombencéphale suggèrent que l'étude de ce phénomène pourrait présenter un double intérêt : (1) mener à la compréhension des bases de la morphogenèse d'une région importante du SNC ainsi que d'une partie de la tête et (2) permettre de disposer d'un schéma conceptuel éventuellement susceptible de s'appliquer à d'autres processus de segmentation chez les vertébrés, comme celui du mésoderne somitique.

Bases cellulaires de la segmentation du rhombencéphale

L'observation d'une succession de renflements le long du tube neural dans la région du rhombencéphale remonte à 1828 [1]. Cependant la démonstration que ces renflements, appelés maintenant rhombomères (r), constituent des unités métamériques n'a été apportée qu'au cours des dernières années, principalement à travers les travaux des groupes de Lumsden et Keynes sur l'embryon de poulet [2, 3]. Les rhombomères sont délimités par une série de constrictions qui apparaissent dans l'épithélium neural et l'on peut en identifier jusqu'à huit le long de l'axe antéro-postérieur. Ces structures sont d'existence transitoire et, chez la souris, elles peuvent être observées entre 8,5 et 10,5 jours de développement embryonnaire *(figure 1)*. La période d'existence des rhombomères correspond à la différenciation de nom-

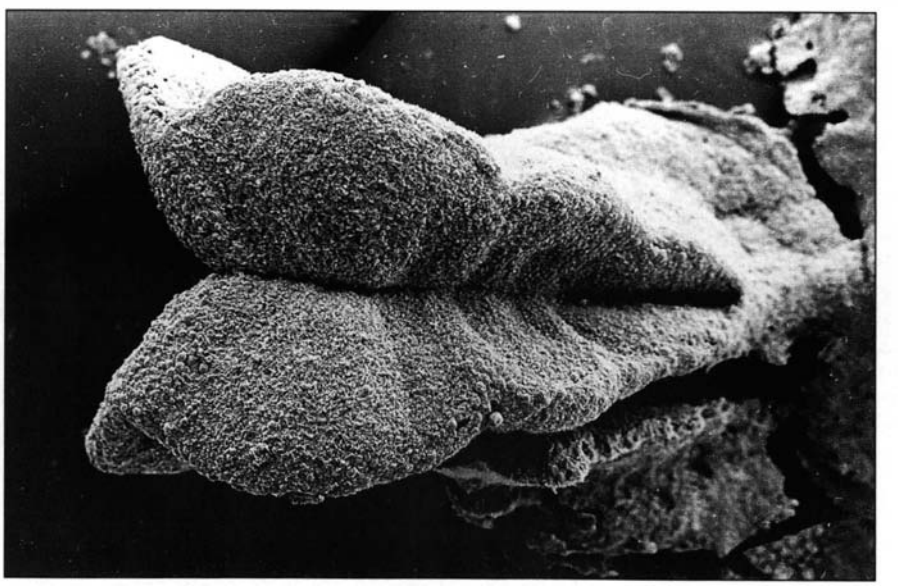

Figure 1. ***Photographie au microscope électronique à balayage d'un embryon de souris de cinq somites.*** *Cette vue permet de distinguer les renflements périodiques que sont les rhombomères. (Reproduit de* Cell *[28].)*

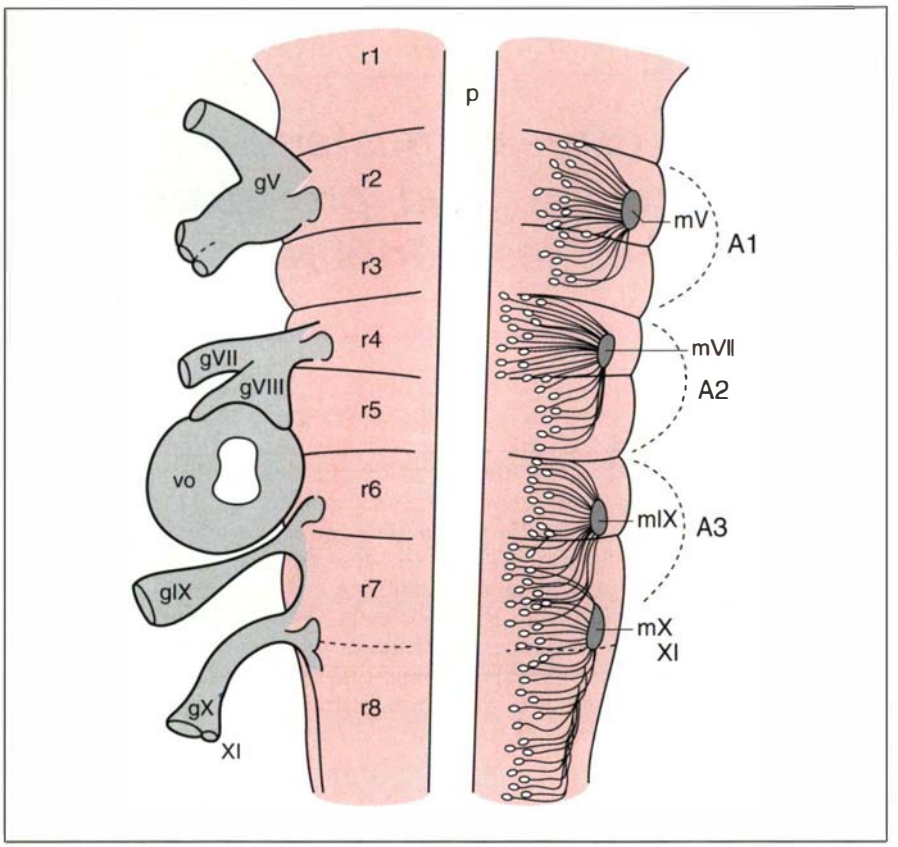

Figure 2. ***Organisation segmentée des nerfs crâniens branchio-moteurs.*** *Représentation schématique du rhombencéphale d'un embryon de poulet au stade 21 montrant les relations entre, d'une part, les ganglions sensoriels crâniens (gV-gX), les noyaux branchio-moteurs (mV-mXI) et les racines combinées des nerfs sensoriels et branchio-moteurs et, d'autre part, les rhombomères (r1-rB) et les arcs branchiaux (A1-A3). vo (vésicule otique), p (plancher). (D'après [2].)*

breux neurones et à la mise en place des structures de base du rhombencéphale.

Les rhombomères constituent des unités répétées de neurogenèse : les premiers neurones à se différencier sont les neurones réticulaires. Ils apparaissent d'abord dans des rhombomères alternés, r2, r4 et r6, puis plus tardivement dans les rhombomères de numéros impairs. Chez le poisson zèbre, où certains neurones réticulaires peuvent être identifiés individuellement, une organisation répétée d'un rhombomère à l'autre a été observée [4]. Mais c'est l'analyse des nerfs branchio-moteurs chez le poulet qui a apporté une preuve définitive de l'organisation métamérique du rhombencéphale. Les nerfs moteurs qui innervent les trois premiers arcs branchiaux, le V (trijumeau), le VII (facial) et le IX (glosso-pharyngien), émergent du cerveau postérieur au niveau de r2, r4 et r6 respectivement. L'étude par marquage rétrograde de la position des corps cellulaires correspondants a révélé une organisation répétée basée sur une coopération entre deux rhombomères successifs [2] : dans chaque cas, le nerf reçoit des contributions d'axones provenant d'une part du rhombomère dans lequel le nerf a sa racine et d'autre part du rhombomère immédiatement postérieur *(figure 2)*. Les ganglions sensitifs de ces nerfs se conforment également à ce profil métamérique *(figure 2)*.

Comment cette organisation segmentée est-elle établie au niveau du rhombencéphale ? Un aspect essentiel de cette question est la délimitation précoce des territoires rhombomériques. Celle-ci pourrait être obtenue par compartimentation, de façon analogue à ce qui est observé chez les insectes. Chez ces animaux, des groupes de cellules fondatrices sont constitués au cours du développement précoce et tous les descendants des cellules d'un groupe construisent une partie particulière de l'organisme, par exemple une moitié d'aile, qui est appelée un compartiment [5]. Les compartiments ont les mêmes limites chez tous les membres de l'espèce, mais à l'intérieur d'un compartiment les cellules fondatrices donnent naissance à des clones de tailles et de formes différentes d'un individu à un autre. La base de la compartimentation est donc un processus de ségrégation cellulaire. Pour analyser la compartimentation éventuelle du rhombencéphale, Fraser et ses collaborateurs ont réalisé une analyse clonale par marquage de cellules individuelles [6]. Leurs résultats indiquent que les limites inter-rhombomériques constituent des frontières que les cellules ne peuvent pas franchir : lorsqu'une cellule est marquée avant l'apparition morphologique des frontières rhombomériques, le clone issu de cette cellule pourra éventuellement envahir deux rhombomères adjacents ; au contraire, si l'injection a lieu après apparition des frontières, les clones sont toujours confinés à l'intérieur d'un seul rhombomère. En conclusion, les rhombomères se comportent comme des unités polyclonales analogues aux compartiments des insectes. Nous verrons plus loin qu'ils partagent avec eux d'autres propriétés. Cependant un domaine du rhombencéphale échappe à la compartimentation, la partie ventrale du tube, appelée plancher.

Quels peuvent être les mécanismes responsables de la formation des compartiments rhombomériques ? Schématiquement, on peut envisager deux types d'hypothèses permettant d'expliquer la ségrégation de leurs cellules : (1) les frontières entre rhombomères successifs constituent des barrières physiques aux migrations cellulaires ; (2) les cellules d'un

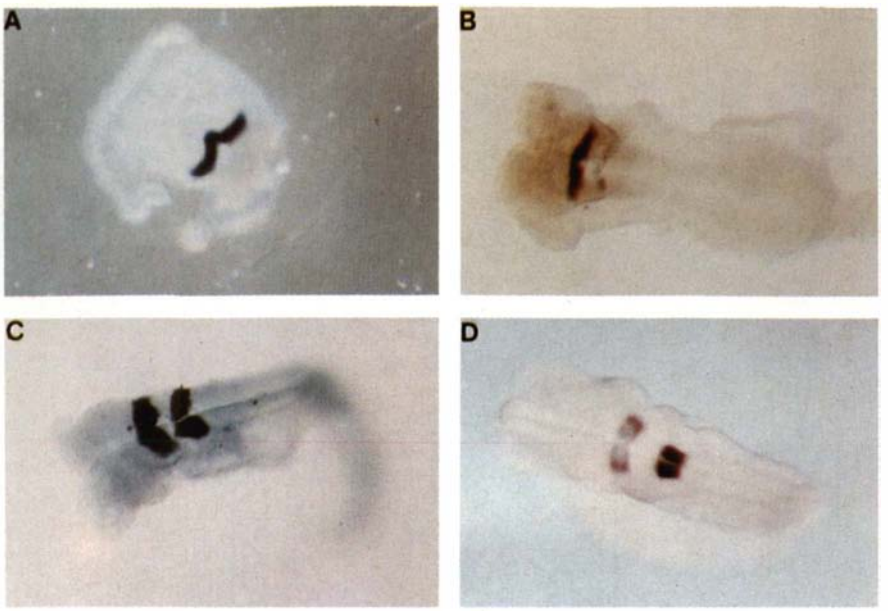

Figure 3. ***Expression de* Krox-20 *au cours du développement embryonnaire.*** *Hybridation* in situ *sur embryon entier de souris avec une sonde* Krox-20. *Les embryons ont les âges suivants : A (8 jours), B (8,5 jours), C (9 jours), D (9,5 jours). (D'après [24].)*

rhombomère possèdent des propriétés de surface spécifiques (en particulier déterminées par des molécules d'adhérence cellulaire) qui font qu'elles s'agrègent préférentiellement entre elles plutôt qu'avec celles d'un autre compartiment. Pour trancher entre ces deux possibilités, Guthrie et ses collaborateurs ont réalisé des greffes ectopiques de parties de rhombencéphale sur des embryons isochroniques chez l'oiseau [7, 8]. La première observation fut de constater qu'un rhombomère transplanté dans une région ectopique conserve son autonomie de différenciation. Nous avons mentionné plus haut la similitude des schémas d'organisation des axones correspondant aux nerfs branchiomoteurs V, VII et IX *(figure 2)*. Néanmoins ceux-ci présentent quelques différences et il est donc possible de les distinguer. La transplantation du rhombomère 4, prélevé immédiatement avant ou après apparition des frontières rhombomériques, à la place du rhombomère 2 donne après différenciation un profil axonal caractéristique du nerf facial (normalement issu de r4) et non du trijumeau [7]. Ainsi, aussi précocement qu'au stade 6 somites, les rhombomères ont acquis leur identité et la conservent indépendamment de leur position dans le neuroépithélium et de signaux éventuels provenant du mésoderme sous-jacent. Cela établi, les greffes ont été utilisées pour confronter des tissus provenant de différents niveaux du rhombencéphale [8]. La juxtaposition d'une partie d'un rhombomère de numéro pair avec une partie d'un rhombomère de numéro impair donne lieu à la reconstruction d'une frontière segmentaire. En revanche, lorsque les tissus mis en contact correspondent à un même rhombomère ou à une combinaison de type r3/r5, r2/r4, ou r4/r6, ils fusionnent sans formation de frontière. Ces résultats suggèrent que la formation des frontières rhombomériques est due à des propriétés de la surface cellulaire qui alternent le long de l'axe antéro-postérieur avec une périodicité de deux rhombomères. Cette périodicité est identique à celle observée au niveau du câblage des nerfs branchio-moteurs. Ainsi la compartimentation pourrait jouer un rôle essentiel dans l'établissement du plan de différenciation du rhombencéphale.

Expression segmentée de gènes de régulation dans le rhombencéphale

Chez les insectes, les compartiments ne sont pas seulement des unités polyclonales de lignage, ce sont également des unités d'expression génétique, c'est-à-dire que toutes leurs cellules expriment spécifiquement certains gènes régulateurs. Certains de ces gènes font d'ailleurs partie du réseau d'expression génétique responsable de la ségrégation des cellules du compartiment. Par analogie, il paraissait possible que les limites des rhombomères des vertébrés constituassent aussi des limites d'expression pour des gènes régulateurs. C'est effectivement ce qui a été observé. Le premier gène identifié présentant un profil d'expression segmenté dans le rhombencéphale s'appelle *Krox-20*. Initialement isolé comme un gène de réponse précoce aux facteurs de croissance, il code pour un facteur de transcription comportant un type particulier de domaine d'interaction avec l'ADN dit « doigts à zinc » [9]. Vers 9 jours de développement embryonnaire chez la souris, *Krox-20* est exprimé spécifiquement dans r3 et r5 [10]. En fait l'expression de *Krox-20* en deux bandes transversales à travers la plaque neurale précède l'apparition morphologique des rhombomères : une première bande, rostrale, correspondant au futur r3 apparaît vers 7,75-8 jours de développement, tandis que la deuxième, plus caudale et correspondant au futur r5 apparaît vers 8,25-8,5 jours *(figure 3)*. Ainsi la segmentation est effective au niveau moléculaire bien avant qu'elle ne soit décelable au niveau morphologique (8,5 jours). Ces résultats suggèrent aussi que *Krox-20* pourrait jouer un rôle dans le contrôle du processus de segmentation proprement dit.

Une deuxième catégorie de gènes codant pour des facteurs de transcription et dont l'expression est régionalisée dans le cerveau postérieur a été identifiée parmi ceux de la famille *Hox* [11]. Ces gènes contiennent une homéoboîte codant pour un type particulier de domaine d'interaction avec l'ADN et, chez les mammifères, sont

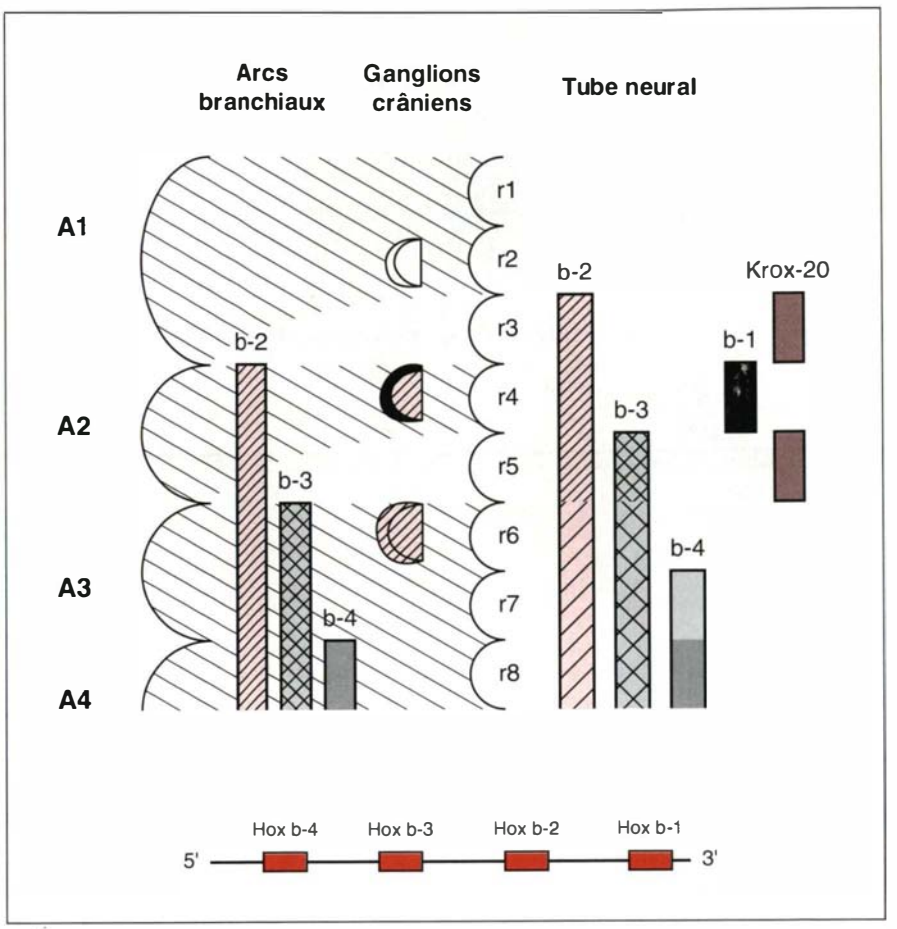

Figure 4. ***Profils d'expression des gènes* Hox *du complexe b dans la région branchiale de la tête vers 9,5 jours de développement chez la souris.*** *Les domaines d'expression de quatre gènes* (Hoxb-1, -2, -3 et -4) *du complexe* Hoxb *ainsi que ceux du gène* Krox-20 *sont indiqués schématiquement dans le rhombencéphale, les ganglions crâniens et les arcs branchiaux (A1-A4). Les rhombomères (r1 à r8) sont indiqués. Les rayures diagonales indiquent les régions du tube neural où la crête est produite et l'arc branchial dans lequel elle migre. Le ganglion situé en regard de r2 est le trijumeau (V), celui en regard de r4 le complexe facial-vestibulaire (VII/VIII), celui en regard de r6 le glossopharyngien (IX). La représentation des profils d'expression dans les ganglions indique que toutes les cellules expriment une combinaison de gènes et non que cette expression est régionalisée dans le ganglion. Les différences d'intensité de coloration dans le tube neural reflètent des différences relatives du niveau d'expression. Les positions relatives des gènes sur le chromosome sont indiquées au bas de la figure. Le gène* Hoxb-1 *fait exception à la règle de colinéarité puisqu'il est exprimé uniquement dans r4 et non jusqu'à r1 inclus comme on pourrait s'y attendre. (D'après [28].)*

groupés en quatre complexes homologues localisés sur des chromosomes différents. La comparaison des séquences nucléotidiques des différents gènes a permis d'aligner les gènes les plus semblables, appelés paralogues, entre les différents complexes et a indiqué que ceux-ci ont été engendrés par duplications successives sans modification de l'ordre des gènes. Ces complexes sont homologues du complexe *bithorax/antennapedia* de la drosophile, dit *HOM*, dont les membres jouent un rôle essentiel dans l'établissement de l'axe antéro-postérieur. L'examen des profils d'expression des gènes *Hox* a permis de démontrer qu'ils respectent une règle dite de colinéarité déjà observée dans le cas des gènes *HOM* de drosophile : la limite antérieure d'expression de chaque gène est d'autant plus rostrale que le gène est situé plus en 3' dans le complexe [12]. Ces arguments, auxquels se sont ajoutés récemment des résultats d'expériences d'inactivation génique *(voir paragraphes suivants)*, suggèrent donc que les gènes *Hox* pourraient jouer un rôle analogue à celui des gènes *HOM* chez la drosophile dans la mise en place du plan d'organisation le long de l'axe antéro-postérieur.

Les gènes *Hox* situés les plus en 3' dans chacun des complexes présentent des limites antérieures d'expression localisées dans le rhombencéphale. En fait, vers 9,5 jours de développement, ces limites antérieures coïncident avec les frontières rhombomériques, les gènes successifs sur le chromosome ayant des limites disposées de deux rhombomères en deux rhombomères [13] *(figure 4)*. Les gènes paralogues présentent des domaines d'expression similaires, mais avec cependant des différences de niveau. Ces profils sont établis entre 7,75 et 8,5 jours : les gènes *Hox* sont d'abord activés dans la partie postérieure du tube neural, puis leurs territoires d'expression s'étendent jusqu'à leurs limites antérieures définitives, avant l'apparition morphologique des rhombomères. Cette chronologie laisse ouverte la possibilité de l'intervention de certains gènes *Hox* dans la délimitation de territoires dans le rhombencéphale et dans le processus de segmentation lui-même. Elle est également compatible avec un rôle dans la différenciation et la définition de l'identité des rhombomères, ce qui serait plus conforme au rôle joué par les gènes homologues chez la drosophile.

D'autres types de facteurs de transcription présentent également des profils d'expression restreints à certains segments du rhombencéphale.

C'est le cas, par exemple, de récepteurs à l'acide rétinoïque ou de gènes à homéoboîte de type *Pax*. De plus, les facteurs de transcription ne sont évidemment pas les seules molécules impliquées dans la formation des rhombomères. Comme nous l'avons évoqué plus haut, celle-ci doit requérir des interactions cellulaires, ce qui suggère l'intervention de molécules d'adhérence et de signalisation intercellulaire ainsi que des composants des cascades de transduction de signaux. Parmi ces derniers, des candidats prometteurs pourraient appartenir à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase car ce type de molécules joue un rôle critique dans l'établissement du plan d'organisation de l'embryon et de l'œil de drosophile. Récemment, nous avons identifié plusieurs gènes appartenant à une même sous-famille codant pour des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase qui sont exprimés spécifiquement dans certains rhombomères. L'un d'entre eux, *Sek (Segmentally expressed kinase)*, est actif dans r3 et r5, comme *Krox-20* [14]. De façon surprenante, *Sek* est également exprimé transitoirement dans le mésoderme paraxial au niveau de deux paires de somites en cours de formation [15]. Ces résultats suggèrent que *Sek* est impliqué dans la transduction de signaux à la fois au cours de la segmentation du rhombencéphale et de celle du mésoderme, deux processus de métamérisation qui présentent des différences morphologiques évidentes. Il est possible que cela reflète une certaine communauté dans les mécanismes moléculaires gouvernant ces deux phénomènes.

La sous-famille de gènes codant pour des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase apparentés à *Sek* suscite actuellement un grand intérêt : elle comporte plus de 18 membres et jusqu'à présent il a été montré qu'au moins 6 d'entre eux présentent des profils d'expression régionalisés dans le rhombencéphale. Les ligands de ces molécules sont encore inconnus ; en particulier, on ne sait pas s'il s'agit de molécules diffusibles, associées à la matrice extracellulaire ou bien membranaires. La similitude des séquences en acides aminés des domaines extracellulaires des kinases de la famille *Sek* suggère que les ligands respectifs pourraient être également des molécules assez proches les unes des autres. Ainsi, on peut imaginer l'existence d'une famille de ligands, d'expression éventuellement régionalisée dans le rhombencéphale et dont l'interaction avec les récepteurs pourrait jouer un rôle essentiel dans l'établissement du profil de développement du rhombencéphale ou dans la communication entre différents territoires de cette région de l'encéphale.

Segmentation du rhombencéphale et morphogenèse de la tête

A côté de son rôle dans l'organisation du système nerveux, la segmentation du rhombencéphale pourrait également remplir une fonction importante dans la morphogenèse de la tête. Au niveau de celle-ci, la plupart des structures cranio-faciales et du système nerveux périphérique ainsi que le tissu conjonctif sont dérivés de la crête neurale, une population de cellules hautement migratrice qui émerge de la partie dorsale du tube neural au moment de sa fermeture [16]. Comme indiqué précédemment, il existe une correspondance entre l'organisation rhombomérique et celle des ganglions périphériques dérivés d'une sous-population de crête dite neurogénique *(figure 2)*. De même on observe également une correspondance entre les rhombomères et les arcs branchiaux : les cellules de crête dite mésenchymale issues de r1 et r2 colonisent le premier arc, celles de r4 le second et celles de r6 le troisième, tandis que r3 et r5 ne fournissent que peu ou pas du tout de cellules de crête *(figure 4)*. De plus, des expériences de greffe ont indiqué que, contrairement à la crête troncale, la crête rhombencéphalique possède avant sa migration à partir du tube une information positionnelle qui gouverne l'identité des structures auxquelles elle va donner naissance [17]. L'étude de l'expression des gènes *Hox* a suggéré que ceux-ci pourraient coder pour une partie de cette information. En effet, les cellules de crête, tant neurogénique que mésenchymale, expriment différents gènes *Hox* avec des limites correspondant aux arcs branchiaux [18]. Les combinaisons de gènes *Hox* actifs dans les cellules de crête correspondent directement à celles exprimées dans le rhombomère dont elles sont issues *(figure 4)*. Ces cellules mémorisent donc leur rhombomère d'origine sous la forme d'un code *Hox* et il est possible que ce code détermine l'identité des structures cranio-faciales auxquelles les cellules doivent participer. Les premiers résultats obtenus par inactivation de gènes *Hox* exprimés dans le rhombencéphale sont compatibles avec cette éventualité : ainsi la mutation du gène *Hoxa-1*, aboutit à des anomalies de la segmentation de r4 et r5 — qui constituent les domaines les plus antérieurs d'expression de ce gène —, et affecte aussi les dérivés de la crête neurogénique au niveau de r4 et r6 [19-21] ; en revanche, la mutation du gène *Hoxa-3* touche en particulier les dérivés de la crête mésenchymale [22]. Ces résultats suggèrent que la segmentation du rhombencéphale intervient dans la définition des schémas de développement des structures cranio-faciales de la région branchiale.

Analyse du contrôle génétique de la segmentation

Comme il est indiqué plus haut, la recherche de gènes dont l'expression est régionalisée très précocement au cours du développement du rhombencéphale est actuellement très intense car elle va, d'une part, fournir de précieux marqueurs permettant de suivre le processus au niveau moléculaire et, d'autre part, des candidats potentiellement impliqués dans son contrôle. Concernant ce second aspect, l'analyse de la régulation de la segmentation a démarré en suivant deux voies : d'une part, la mise en évidence du rôle de certains gènes, en modifiant leur expression et en analysant les phénotypes associés et, d'autre part, l'étude des cascades ou réseaux de régulation, en établissant les hiérarchies de contrôle. En ce qui concerne la démonstration de l'intervention de gènes dans la régulation du processus, les résultats les plus significatifs jusqu'à présent ont été obtenus par inactivation chez la souris après recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnai-

res [23]. Nous avons déjà évoqué les conséquences de la mutation des gènes *Hoxa-1* et *Hoxa-3* au niveau des dérivés de la crête neurale. Des résultats récents obtenus par l'équipe de P. Chambon (Strasbourg, France) suggèrent que, dans le tube neural, l'effet de la mutation de *Hoxa-1* est l'élimination d'une grande partie de r4 et r5 [21]. De façon similaire, nos travaux concernant l'inactivation du gène *Krox-20* suggèrent que celui-ci est requis pour la persistance de r3 et r5 (Schneider-Maunoury *et al.*, soumis pour publication). Ainsi ces premiers résultats étayent pleinement l'idée que certains gènes exprimés de façon régionalisée dans le rhombencéphale jouent un rôle dans le contrôle de la segmentation ou de l'acquisition d'identité des rhombomères. L'examen des phénotypes associés à ces mutations nous renseigne sur le rôle physiologique de ces gènes. Mais ces mutations peuvent également constituer des clefs importantes pour aborder l'étude de leur fonction au niveau moléculaire. Ainsi, chez les embryons porteurs de ces mutations, il est maintenant possible d'examiner les profils d'expression des autres gènes et de déterminer si la mutation les a modifiés. Cela devrait permettre de commencer à décrypter les réseaux de régulation gouvernant la morphogenèse du rhombencéphale. Une première relation hiérarchique a pu être établie dans le cas des gènes *Krox-20* et *Hoxb-2* : nous avons pu identifier une séquence nucléotidique localisée en amont du gène *Hoxb-2* qui constitue un activateur transcriptionnel responsable de son expression dans r3 et r5 [24]. Cet activateur comporte trois sites de fixation pour la protéine Krox-20 et la destruction de ces sites par des mutations ponctuelles spécifiques abolit son activité, impliquant directement Krox-20 dans l'activation transcriptionnelle de *Hoxb-2*. L'analyse des mutants du gène *Krox-20* a permis de confirmer ce résultat.

Conclusion

L'apparition de la crête neurale a conditionné au cours de l'évolution le développement de la tête des vertébrés [25]. Ceux-ci ont pu en particulier adopter des stratégies de segmentation différentes pour l'établissement des schémas de développement dans la tête et dans le tronc. Si, au niveau du tronc, la moelle épinière est bien segmentée, ce n'est pas apparemment une propriété intrinsèque de cette structure mais une conséquence de l'organisation métamérique du mésoderme paraxial en somites [26]. Les somites remplissent en particulier deux fonctions essentielles : fournir les précurseurs de plusieurs types cellulaires participant aux structures axiales et organiser ces structures sur un mode segmenté. Dans la tête, rostralement à r7, les somites sont absents et la majorité des tissus qui en sont dérivés au niveau troncal sont fournis par la crête neurale. Au niveau du rhombencéphale, comme nous l'avons vu, le tube neural est segmenté de façon intrinsèque et instruit partiellement la crête branchiale qui elle-même véhicule cette information jusqu'aux arcs branchiaux. Ainsi c'est vraisemblablement l'apparition de la crête neurale qui a autorisé à la jonction céphalo-troncale l'établissement d'une transition fondamentale dans l'origine tissulaire d'un processus morphogénétique, la segmentation, essentiel pour l'établissement du profil de développement. Il est possible que cette prépondérance du tube neural dans la région antérieure de l'embryon ait constitué l'une des conditions du développement de l'encéphale des vertébrés au cours de l'évolution.

Des progrès spectaculaires ont été réalisés au cours des dernières années dans l'isolement de gènes régulateurs potentiels de la morphogenèse du rhombencéphale. Le premier élément d'un réseau de régulation transcriptionnel a même été identifié. L'acquisition de connaissances concernant ce réseau et la fonction effective des différents gènes devrait encore s'accélérer avec l'analyse systématique des différents gènes par mutagenèse par recombinaison homologue. Est-ce à dire que nous pouvons espérer atteindre une compréhension détaillée du processus de définition des territoires rhombomériques au niveau moléculaire au cours des prochaines années ? Cela est loin d'être sûr. En effet, les gènes identifiés jusqu'à présent l'ont été généralement sur la base d'appartenance à des familles multigéniques déjà connues. Il est ainsi possible que nous soyons passés à côté d'autres classes de gènes essentiels. En particulier, il n'est pas clair que nous disposions actuellement des gènes responsables de la définition précoce des territoires. De même, en aval, nous ne sommes pas capables de relier les gènes régulateurs aux manifestations cellulaires de la segmentation. Comme nous l'avons indiqué, la formation des compartiments doit impliquer en particulier l'expression de molécules d'adhérence spécifiques. Or les gènes correspondants ne sont pas connus, bien que l'on suspecte qu'ils puissent constituer des cibles directes des gènes *Hox*. Ainsi il est clair qu'un effort considérable devra être effectué dans ces directions si nous voulons comprendre un jour l'intégralité du processus de segmentation. Enfin, le rhombencéphale constitue-t-il la seule région du SNC segmentée intrinsèquement ? Des résultats récents suggèrent l'existence de quatre compartiments disposés le long de l'axe antéro-postérieur au niveau du diencéphale [27]. Ils sont fondés d'une part sur des observations de restrictions de lignage cellulaire et, d'autre part, sur l'analyse des domaines d'expression, en particulier de gènes à homéoboîte n'appartenant pas à la famille *Hox*. Ainsi, il est possible que des processus de segmentation soient également à l'œuvre dans les régions antérieures de l'encéphale, renforçant l'intérêt heuristique de l'analyse des mécanismes gouvernant la morphogenèse du rhombencéphale ■

Christine Vesque
Nathalie Becker
Tania Seitanidou
Patrick Charnay
Inserm U. 368, biologie moléculaire du développment, Ecole Normale Supérieure, 46, rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05, France.

RÉFÉRENCES

1. von Baer KE. Über die Entwicklungsgeschichte der Thiere. Konigsberg, 1828.
2. Lumsden A, Keynes R. Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* 1989 ; 337 : 424-8.
3. Lumsden A. The cellular basis of segmentation in the developing hindbrain. *Trends Neurosci* 1990 ; 13 : 329-35.
4. Hanneman E, Trevarrow B, Metcalfe WK, Kimmel CB, Westerfield M. Segmental pattern of development of the hindbrain an spinal cord of the zebrafish embryo. *Development* 1988 ; 103 : 49-58.
5. Lawrence P. Compartments in vertebrates ? *Nature* 1990 ; 344 : 382-3.
6. Fraser S, Keynes R, Lumsden A. Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions. *Nature* 1990 ; 344 : 431-5.
7. Guthrie S, Muchamore I, Kuroiwa A, Marshall H, Krumlauf R, Lumsden A. Neuroectodermal autonomy of *Hox-2.9* expression revealed by rhombomere transpositions. *Nature* 1992 ; 356 : 157-9.
8. Guthrie S, Lumsden A. Formation and regeneration of rhombomere boundaries in the developing chick hindbrain. *Development* 1991 ; 112 : 221-9.
9. Chavrier P, Zerial M, Lemaire P, Almendral J, Bravo R, Charnay P. A gene encoding a protein with zinc fingers is activated during G0/G1 transition in cultured cells. *EMBO J* 1988 ; 7 : 29-35.
10. Wilkinson D, Bhatt S, Chavrier P, Bravo R, and Charnay P. Segment-specific expression of a zinc finger gene in the developing nervous system of the mouse. *Nature* 1989 ; 337 : 461-4.
11. McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 1992 ; 68 : 283-302.
12. Duboule D, Dollé P. The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. *EMBO J* 1989 ; 8 : 1497-505.
13. Wilkinson DG, Bhatt S, Cook M, Boncinelli E, Krumlauf R. Segmental expression of Hox-2 homeobox-containing genes in the developing mouse hindbrain. *Nature* 1989 ; 341 : 405-9.
14. Gilardi-Hebenstreit P, Nieto MA, Frain M, Mattéi MG, Chestier A, Wilkinson D, Charnay P. An EPH-related receptor protein-tyrosine kinase gene segmentally-expressed in the developing mouse hindbrain. *Oncogene* 1992 ; 7 : 2499-506.
15. Nieto MA, Gilardi-Hebenstreit P, Charnay P, Wilkinson D. A receptor protein tyrosine kinase implicated in the segmental patterning of the hindbrain and mosoderm. *Development* 1992 ; 116 : 1137-50.
16. Le Douarin N. The neural crest. Cambridge : Cambridge University Press, 1982.
17. Noden D. The role of the neural crest in patterning of avian skeletal, connective, and muscle tissues. *Dev Biol* 1983 ; 96 : 144-65.
18. Hunt P, Gulisano M, Cook M, Sham MH, Faiella, Wilkinson D, Boncinelli E, Krumlauf R. A distinct *Hox* code for the branchial region of the vertebrate head. *Nature* 1991 ; 353 : 861-4.
19. Chisaka O, Musci TS, Capecchi MR. Developmental defects of the ear, cranial nerves and hindbrain resulting from targated disruption of the mouse homeobox gene *Hox-1.6*. *Nature* 1992 ; 355 : 516-20.
20. Lufkin T, Dierich A, Lemeur M, Mark M, Chambon P. Disruption of the *Hox-1.6* homeobox gene results in defects in a region corresponding to its rostral domain of expression. *Cell* 1991 ; 66 : 1105-19.
21. Mark M, Lufkin T, Vonesch JL, Ruberte E, Olivo JC, Dollé P, Gorry P, Lumsden A, Chambon P. Two rhombomeres are altered in *Hoxa-1* null mutant mice. *Development* 1993 (sous presse).
22. Chisaka O, Capecchi MR. Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *hox-1.5*. *Nature* 1991 ; 350 : 473-9.
23. Babinet C. Les cellules souches embryonnaires de souris : une voie privilégiée de transformation génétique à l'échelle de l'animal. *médecine/sciences* 1992 ; 8 : 268-75.
24. Sham MH, Vesque C, Nonchev S, Marshall H, Frain M, Das Gupta R, Whiting J, Wilkinson D, Charnay P, Krumlauf R. The zinc finger gene *Krox20* regulates *HoxB2 (Hox2.8)* during hindbrain segmentation. *Cell* 1993 ; 72 : 183-96.
25. Stern CD, Jacques KF, Lim TM, Fraser SE, Keynes RJ. Segmental lineage in the chick embryo spinal cord depends on the adjacent somites. *Development* 1991 ; 113 : 239-44.
26. Gans C, Northcutt RG. Neural crest and the origin of vertebrates : a new head. *Science* 1983 ; 220 : 268-74.
27. Figor MC, Stern CD. Segmental organization of embryonic diencephalon. *Nature* 1993 ; 363 : 630-4.
28. Hunt P, Krumlauf R. Deciphering the *Hox* code : clues to patterning branchial regions of the head. *Cell* 1991 ; 66 : 1075-8.

TIRÉS A PART

P. Charnay.

ERASMUS

COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES

PROGRAMME INTERUNIVERSITAIRE DE COOPÉRATION PIC

DIPLÔME EUROPÉEN DE REPRODUCTION HUMAINE

Programme ÉRASMUS

UNIVERSITÉ PAUL-SABATIER. TOULOUSE III
Centre de Stérilité Masculine - CECOS Midi-Pyrénées
Hôpital La Grave — 31052 TOULOUSE CEDEX FRANCE
Coordinateur : Pr. F. Pontonnier
Secrétariat : 61.77.79.01 — Fax : 61.77.78.43

UNIVERSITÉ MONTPELLIER I
Centre Hospitalier Universitaire — Servie Urologie
5, rue Hoche — 30000 NIMES FRANCE
Coordinateur : Pr. H. Navratil
Secrétariat : 66.27.33.53 — Fax : 66.27.34.89

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Clinique de Stérilité et d'Endocrinologie gynécologique
Hôpital Cantonal Universitaire Genève
1211 GENÈVE 4 SUISSE
Coordinateur : Pr. A. Campana
Secrétariat : 22.382.43.02 — Fax : 22.347.64.86

UNIVERSITAT AUTONOMA BARCELONA
Departament de Biologia Cellular y de Fisiologia
Unitat de Biologia Cellular — Edifici C
08193 BELLATERRA BARCELONA ESPAGNE
Coordinateur : Pr. J. Egozcue
Secrétariat : 34.3.581.18.39 — Fax : 34.3.581.22.95

Coordination Générale :
Dr L. Bujan - Pr. F. Pontonnier

DOMAINE D'ÉTUDES :
Reproduction Humaine

THÈMES ABORDÉS : (liste non limitative)
Aspects physiologiques et pathologiques, moyens d'exploration cliniques, biologiques et thérapeutiques médicales et chirurgicales. Aspects psychosexuels de la reproduction humaine, aspects éthiques et socio-économiques. Avancées de la recherche dans ces domaines.

ORGANISATION DES COURS/SÉMINAIRES :
160 heures au total sous forme d'enseignement intensif de 4 semaines réparties dans l'année 1993-1994. Enseignement du 3e cycle.

LIEU : Une semaine dans chaque Université participante. Les différents enseignants étant intégrés dans les équipes de recherche travaillant en Reproduction Humaine et Animale feront bénéficier les candidats de leur savoir-faire et de leurs connaissances.

INSCRIPTIONS :
Pré-requis : Étudiants ayant un certificat ou un diplôme dans le domaine de la reproduction humaine ou animale délivré par une des 4 universités enseignantes ou une équivalence reconnue par la Commission pédagogique, après audition du candidat par cette Commission.
Langue officielle : Anglais.
Nombre d'étudiants : 40 maximum - 10 par Université.

RENSEIGNEMENTS : Auprès de chaque secrétariat responsable dans chaque université.